

Aus dem Institut für Rechtsmedizin
der Universität Erlangen - Nürnberg
Direktor: Professor Dr. H.-B. Wuermeling

Histoautoradiographische Untersuchungen an konservierter Rattenepidermis

Inaugural - Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde
der Medizinischen Fakultät
der Friedrich-Alexander-Universität
Erlangen - Nürnberg

vorgelegt von
Thomas Welscher
aus Erlangen

1903

Aus dem Institut für Rechtsmedizin
der Universität Erlangen - Nürnberg
Direktor: Professor Dr. H.-B. Wuermeling

Histoautoradiographische Untersuchungen an konservierter Rattenepidermis

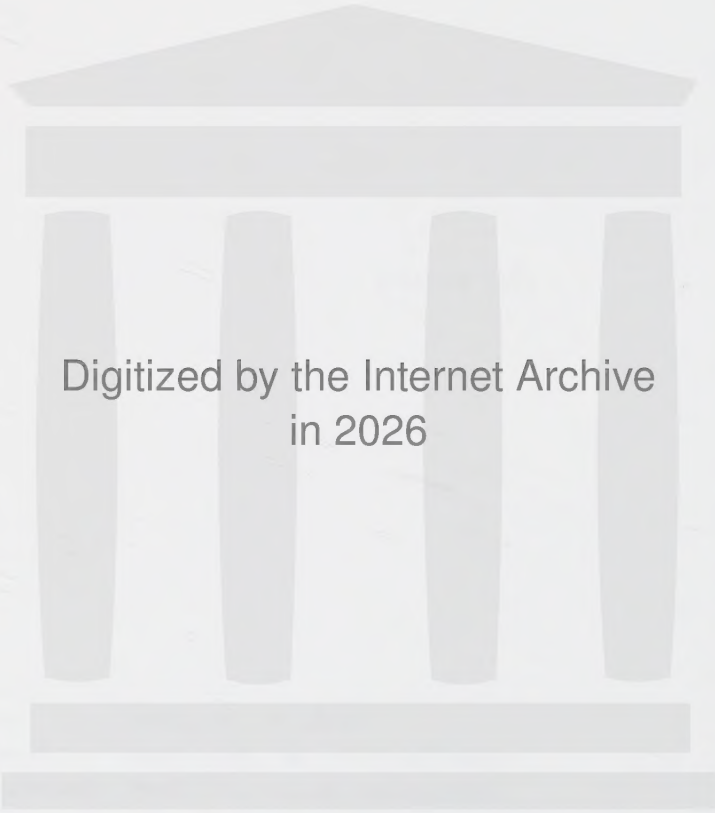
Inaugural - Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde
der Medizinischen Fakultät
der Friedrich-Alexander-Universität
Erlangen - Nürnberg

vorgelegt von
Thomas Welscher
aus Erlangen

Gedruckt mit Erlaubnis der Medizinischen Fakultät
der Universität Erlangen-Nürnberg

Dekan: Prof. Dr. F. Wolf
Referent: Priv.-Doz. Dr. B. Schellmann
Korreferent: Prof. Dr. H.-B. Wuermeling
Tag der mündlichen Prüfung: 25.06.1984

Für Gerlinde



Digitized by the Internet Archive
in 2026

Inhalt	Seite
1. EINLEITUNG	2
1.1 Verfahren zur Konservierung von Frischzell- verbänden	2
1.2 Prinzip der Histoautoradiographie	8
1.3 Postmortale Inkorporation von ^3H -Thymidin in die Epidermis von Ratte und Mensch	9
2. AUFGABENSTELLUNG	10
3. MATERIAL UND METHODE	11
3.1 Versuchsmaterial und -bedingungen	11
3.2 Materialentnahme, Lagerungsbedingungen	11
3.3 Histoautoradiographische Technik	12
3.4 Auswertung der Schnitte	13
4. ERGEBNISSE	16
4.1 Inkorporationsraten nach Lagerung bei $+4^{\circ}\text{C}$ ohne Medium	16
4.2 Inkorporationsraten nach Lagerung bei $+4^{\circ}\text{C}$ im Medium	19
4.3 Inkorporationsraten nach Lagerung bei -18°C ohne Medium	21
5. DISKUSSION	23
6. ZUSAMMENFASSUNG	27
7. LITERATURVERZEICHNIS	29

1. EINLEITUNG

1.1 Verfahren zur Konservierung von Frischzellverbänden

In den letzten Jahren wurde mehrfach über Untersuchungen berichtet, die mit Blickrichtung auf Möglichkeiten einer optimalen Konservierung menschlichen und tierischen Gewebes durchgeführt worden waren. Ihre praktische Anwendung finden diese Untersuchungen vorwiegend in der Transplantationschirurgie, schwerpunktmäßig bei der Übertragung von Hautgewebe und Hornhaut.

Es gibt inzwischen zahlreiche Methoden zur Lagerung von Frischzellverbänden, wobei eine Einteilung meist nach der Aufbewahrungstemperatur vorgenommen wird (PERRY 1966). Uns interessierten besonders die

Lagerung bei Temperaturen über 0°C (Kühlung der Gewebe im Medium) und die

Lagerung bei Temperaturen unter 0°C mit/ohne Vorbehandlung im kryoprotektiven Medium (Gefrieraufbewahrung).

Die Kühlung im präservativen Medium ist am längsten bekannt und geht auf die Anfänge der Kryobiologie zurück (z. B. CARREL 1912). Sie ist gleichzeitig das in der Praxis am meisten verwendete Verfahren in der kurz- und mittelfristigen Konservierung (6 - 8 Wochen) von Geweben, besonders von Hornhäuten.

1903 hat WENTSCHER menschliches Hautgewebe, gebettet auf angefeuchtete Verbandgaze, in einem ungeheizten aber frostfreien Zimmer bei Temperaturen um $+10^{\circ}\text{C}$ über 7 Tage, in einigen Fällen über 14 Tage aufbewahren können.

CARREL gelang 1912 der Nachweis, daß Teile von Milz, Herz und Haut, entnommen aus Hühnerembryonen, eine Lagerung in

RINGER-Lösung über 1, 2 und 6 Tage im Kühlschrank bei Temperaturen zwischen -1°C und $+7^{\circ}\text{C}$ überstanden und nach Inkubation in Hühnerplasma Wachstum zeigten. In weiteren Experimenten wurden unter gleichen physikalischen Bedingungen Stücke von Hundehaut in Petrolat, einer Salbengrundlage aus verschiedenen Kohlenwasserstoffen, über 1 bis 10 Tage konserviert und zur Homotransplantation verwendet. Weiter erwies sich im Vergleich verschiedener nutritiver Medien Plasma als günstig zur Lagerung von Hundehypophysen und -periost im Inkubator bei $+38^{\circ}\text{C}$.

KUWAHARA u. Mitarb. (1965) führten Versuche zu mehreren Fragestellungen an Kaninchen-, Affen- sowie menschlichen Hornhautpräparaten durch. U. a. konnten die Autoren eine kurzfristige Konservierung (bis zu 7 Tagen) menschlicher Hornhäute mittels einer "bilanzierten" Elektrolytlösung, der Glukose, 1 % Mukopolysaccharide und 0.1 % Ascorbinsäure zugesetzt waren, erreichen. MIZUKAWA gab 1968 ein Nährmedium aus MEDIUM TC 199, Mukopolysacchariden, Adenosin und Adenin an, in dem menschliche Hornhäute über eine Woche aufbewahrt und anschließend erfolgreich für eine Keratoplastik verwendet werden konnten.

In einer elektronenoptischen Untersuchung wiesen SAKIMOTO u. Mitarb. 1974 nach, daß sich Kaninchenhornhäute, die bei $+4^{\circ}\text{C}$ in modifizierter KREBS-RINGER-Lösung unter Zusatz von 5 oder 10 % Dextran 40 (SIGMA CHEMICAL Co., St. Louis, Mo.) in einer speziell entworfenen Kammer konserviert worden waren, noch nach 14 Tagen strukturell weitgehend unversehrt zeigten. Andere Zusätze wie Glukose, Glutathion und Adenosin zum Medium erwiesen sich als überflüssig.

Bei WALLER (1976) fand zur Aufbewahrung von Kaninchenhornhäuten ebenfalls eine Lösung von 5 % Dextran T 40 (CARL ROTH, Karlsruhe) in Kombination mit MCCOY's 5a MEDIUM (GIBCO, Schottland) und Gentamycinsulfat ($250\text{ }\mu\text{g/ml}$, E. MERCK, Darmstadt) Verwendung, die bei $+4^{\circ}\text{C}$ eine gute Gewebsbehandlung

Über 6 Tage gewährte.

Zur 24-stündlichen Bestimmung des Metabolitengehalts im Rinderhornhautepithel über 1 Woche benutzten SCHMIDT-MARTENS u. Mitarb. (1977) eine Mischung aus MEDIUM TC 199 (FLOW LABORATORIES, Bonn) und 15 % fetalem Kälberserum (FLOW LABORATORIES, Bonn) mit Penicillin (50 I.E./ml), die wiederum auf +4° C gekühlt wurde.

Der von verschiedenen Autoren angegebene Zusatz von Antibiotika zu den Medien erfolgte unter dem Gesichtspunkt, mikrobielles Wachstum während einer Lagerung/Inkubation zu verhindern.

Zur Lagerung von Gelenkknorpel von Kaninchen verwendeten BRIGHTON u. Mitarb. (1979) STANDARD TISSUE CULTURE MEDIUM (EAGLE'S MINIMAL ESSENTIAL MEDIUM : NCTC 135 : 10 % fetales Kälberserum) über 7, 21 und 60 Tage bei +4° C, +21° C und +37° C in 5 % CO₂-Atmosphäre, wobei nur die bei +37° C konservierten Explantate - gemessen an der ³⁵S-Inkorporation in DNS und Protein - überlebten. In einem weiteren Versuch wurde dem Medium bei +37° C 200 µg/ml α-Tokopherol (Vitamin E) über jeweils 10 und 30 Tage zugesetzt.

Den vorläufigen Schlußpunkt unter die Entwicklung auf dem Gebiet der kurzfristigen Lagerung von Hornhäuten setzten 1974 McCAREY und KAUFMAN, die anhand elektronenmikroskopischer Befunde nachweisen konnten, daß Kaninchenhornhäute, die über 14 Tage in M-K-MEDIUM, bestehend aus MEDIUM 199 (MICROBIOLOGICAL ASSOCIATES Inc.), 5 % Dextran 40 (SIGMA CHEMICAL Co.) und 100 I.E./ml Streptomycin-Penicillin-Zusatz, gelagert worden waren, ihre endotheliale Zellintegrität behielten. Folgeuntersuchungen zu verschiedenen Fragestellungen unter Verwendung des M-K-MEDIUMS wurden von mehreren Autoren durchgeführt (AQUAVELLA 1975, BIGAR 1975, VAN HORN 1975, FRIEDLAND 1976, THOFT 1976, MASCARELLA 1979).

Viel später als die Lagerung von Frischzellverbänden in präservativen Medien bei Temperaturen oberhalb von 0°C hat sich die sogenannte Gefrieraufbewahrung entwickelt. Erst 1939 begannen MIDER u. Mitarb. mit Versuchen, die als Grundlage für eine Langzeitkonservierung dienen sollten. Sie konnten bei der histologischen Untersuchung homolog verpflanzter Rattenhaut nachweisen, daß Hautgewebe eine Lagerung über 24 Stunden bei -74°C mit anschließendem schnellen Auftauen überstand und langsames Abkühlen günstigere Auswirkungen zeigte als rasches Gefrieren.

Seit dem Bericht von POLGE u. Mitarb. (1949), daß Glycerin wahrscheinlich das Ausmaß eines Kälteschadens auf Gewebe reduziert, gewann die Kältekonservierung wesentlich an Effektivität. Diese Autoren fanden, daß Spermatozoen, die in RINGER-Lösung mit 40 % Glycerinzusatz eingetaucht worden waren, nach raschem Frieren bis zu -79°C mit nachfolgendem Auftauen vollständig lebensfähig blieben.

In der Folgezeit wurden glyzerinhaltige KREBS-RINGER-Lösungen mit Glycerinkonzentrationen zwischen 10 und 25 % bei -79°C zur Aufbewahrung (bis zu 500 Tagen) und Transplantation von Schweinehaut mit Erfolg verwendet (MEDAWAR 1954).

Unabhängig von der Aufbewahrungstemperatur (-20°C , -40°C , -70°C) erwiesen sich 10 - 15 % Glycerinlösungen in Kombination mit Hydroxypolygelatine/3 % Kaliumzitrat als optimale Medien für eine Konservierung von Hautgewebe von Mensch und Hund bis zu einer Länge von 220 Tagen, unter der Voraussetzung, daß die Proben schnell aufgetaut wurden. Als Parameter für die Überlebensrate der Haut wurde in dieser Untersuchung der Sauerstoffverbrauch bestimmt (GEORGIADIS 1956). Auch DE LOECKER stellte 1976 in einem Vergleich der Inkorporationsraten von ^{14}C -Glyzin in Rattenhaut die Wirkung von 15 % Glycerinzusatz (MERCK) zu HANK'S BALANCED SALT SOLUTION (HBSS, FLOW LABORATORIES), KREBS-RINGER-Bikarbonatpuffer oder 0.65 % Kochsalzlösung mit 3 % Sorbit heraus (Lagerung der Hautproben über 5 und 30 Tage bei

-196⁰ C).

In einer Studie zur ultrastrukturellen Alteration von menschlichem Hautgewebe unter dem Einfluß verschiedener kryoprotektiver Substanzen bestätigte BIAGINI (1979) die günstige Wirkung von 3 % und 7 % Glyzerinzusatz zu HBSS. Das verwendete Hautmaterial wurde auf verschiedene Art auf -196⁰ C abgekühlt, über 24 Stunden oder 7 Tage gelagert und nach Fixierung elektronenoptisch untersucht.

Seither wurden mehrere Substanzen mit ähnlich kryoprotektiven Eigenschaften unterschiedlichen Ausmaßes beschrieben (Dimethylsulfoxid, Glykole, Alkohole, Sorbit, Mannit, Ammoniumazetat, Trimethylaminazetat, Polyvinylpyrrolidon u. a.), unter denen das von BARLYN im Jahr 1964 eingeführte Dimethylsulfoxid (DMSO) die weitere Entwicklung bestimmte.

Die angeführten kryoprotektiven Stoffe unterscheiden sich hinsichtlich ihres Wirkungsorts und -mechanismus. Ausschließlich extrazellulär wirksame Substanzen reduzieren im wesentlichen die an der Zytoplasmamembran wirksamen physikalisch-osmotischen Kräfte, indem sie einen zu raschen Verlust zellulär gelöster Bestandteile bei Abkühlung der Gewebe verhindern. Die Wirkung penetrierender Substanzen wie Glyzerin und DMSO besteht darin, daß sie mit Wasserstoffatomen der Wassermoleküle in Verbindung treten und die Aggregation der Di- und Trihydrogruppen bei Temperaturen unter 0⁰ C zu Tetrahydrogruppen, dem Kennzeichen von Eis, verhindern und dadurch die Eisbildung in der Zelle während des Gefrierens reduzieren (BIAGINI 1979).

Gefrierschutzmittel stellen auch eine Art Puffersystem gegen die relativ ansteigende Elektrolytkonzentration in der Zelle dar, die Folge des Wasserentzugs während des Einfriervorgangs ist (WALLER 1973).

Beim Einsatz aller Medien, die kryoprotektive Substanzen enthalten, besteht die Notwendigkeit, einmal die effektive

Konzentration zusammen mit einer optimalen Einwirkungszeit zu finden und gleichzeitig die für jedes Gewebe unterschiedlich günstige Zeitspanne der Abkühlung und des Auftauens zu beachten. Weiterhin muß das Ausmaß ihrer zytotoxischen Aktivität so gering wie möglich gehalten werden.

LEHR und BERGGREN (1964) wiesen nach, daß DMSO und Glyzerin in 10 % Konzentration etwa die gleiche Schutzwirkung entfalten, während BIAGINI (1979) den Effekt von DMSO ungünstiger beurteilte.

1965 fanden CAPELLA u. Mitarb. ein Medium aus Serum (der betreffenden Spezies) bzw. 25 % Humanalbumin, 7.5 % DMSO und 10 % Saccharose, das sich für eine Konservierung von Kaninchen-, Katzen- und menschlichen Hornhäuten bei Temperaturen von -160°C und -196°C über mehrere Monate eignete. BERGGREN benutzte im gleichen Jahr 10 % DMSO in isotoner Kochsalzlösung bei -196°C zur Lagerung und anschließender Transplantation von menschlicher Haut. 1970 übertrug ABBOTT die Haut von Mäusen, die zuvor über 10 Tage bis zu 10 Monaten bei -156°C , der Temperatur von Stickstoff über der flüssigen Phase, in HBSS mit 2 % fetalem Kälberserum und 15 % DMSO gehalten worden war.

Eine zufriedenstellende Blutstillung mit menschlichen Thrombozyten erreichte VALERI 1974, indem er diese in einem einfachen Verfahren in Plasma, dem 6 % DMSO zugesetzt war, in der Tiefkühltruhe bei -80°C über 24 Stunden bis zu 6 Wochen aufbewahrte. Zum Transport und anschließender autologer Replantation von Kaninchenhaut verwendete NATHAN (1978) ebenfalls Temperaturen von -80°C bzw. -70°C (Tiefkühltruhe). Die Gefrieraufbewahrung erfolgte über 1 bis 20 Tage in MEDIUM 199 und fetalem Kälberserum, unter Zusatz von 10 % DMSO und Glukose.

BOREN (1978) erzielte bei der autologen Replantation von Femoralarterien bei Hunden gleichwertige oder sogar bessere

Ergebnisse mit gefrieraufbewahrten Präparaten als mit frischen bezüglich intimaler Integrität, Gewebeabstoßung und Thrombogenität der Oberfläche. Seine experimentelle Studie unterstützt die These, daß die Gefrieraufbewahrung bis zu 3 Monaten in flüssigem Stickstoff unter Verwendung einer 15 % Lösung DMSO mit Methylprednisolon (5 mg/ml) eine geeignete Methode darstellt, um kleine Blutgefäße zu konservieren.

Um die Wirkungsweise von ATP und verschiedener anorganischer Phosphatverbindungen an Rattenhaut zu prüfen, die bei -3°C und -196°C gelagert wurde, verwendete DE LOECKER (1979) eine Lösung aus 10 % DMSO in KREBS-RINGER-Bikarbonatpuffer mit Antibiotikazusatz. Mit Ausnahme des ^3H -Thymidin-Einbaus in die DNS bewirkte die Zugabe dieser Substanzen einen Anstieg der metabolischen Aktivität der Haut, gemessen an der Inkorporation von ^{14}C -Glyzin oder ^{14}C -Aminoisobuttersäure.

1979 wurde von KAPLAN eine Methode zur Lagerung allogener (vitaler?) Haut angegeben, die bei Transplantation ein Wachstum pathogener Mikroorganismen sowie eine Sensibilisierung des Empfängerorganismus verhindern soll. Die Aufbewahrung erfolgte ohne Kühlung in isotoner Kochsalzlösung unter Zusatz von 15 % Glyzerin und Formaldehyd (0.25 ml/100 ml).

1.2 Prinzip der Histoautoradiographie

Seit Einführung der Autoradiographie ist es möglich, dynamische Stoffwechselvorgänge innerhalb der Zelle zu untersuchen. Den Zellen wird ein radioaktiver Vorläufer, d. h. eine Substanz, deren Einbau oder Verbleib in der Zelle während eines Stoffwechselprozesses verfolgt und topographisch festgelegt werden soll, angeboten (AMLACHER 1974).

Zum Nachweis aktiver Zelleistungen, die den Zellkern betreffen, verwendet man als Trägersubstanz vorzugsweise den DNS-Vorläufer Thymidin, das im Molekül durch das radioaktive Nuklid Tritium (^3H) markiert ist. Dieses ^3H -Thymidin wird aus-

schließlich während der DNS-Synthesephase in den Zellkern inkorporiert. Im ^3H -Kernzerfall werden Betastrahlen ($E_{\text{max}} = 18 \text{ keV}$, $\bar{E} = 5.5 \text{ keV}$) geringer Reichweite (maximale Reichweite etwa $2 \mu\text{m}$) emittiert, die in einem chemisch-photographischen Vorgang Bromsilberkristalle einer photographischen Schicht (Filmemulsion) ionisieren. Die entstandenen metallischen Silberkörner werden durch einen Entwicklungsprozeß sichtbar gemacht und können unter dem Mikroskop identifiziert und einem Zellkern zugeordnet werden.

1.3 Postmortale Inkorporation von ^3H -Thymin in die Epidermis von Ratte und Mensch

Histoautoradiographische Untersuchungen an tierischem und menschlichem Hautgewebe, die im Hinblick auf Möglichkeiten einer Bestimmung des Todeszeitpunkts durchgeführt wurden, zeigten, daß die Temperatur bei der Lagerung der Tierkadaver und Leichen in hohem Maß die postmortalen Einbauaktivitäten des Thymins in den Zellkern beeinflußt.

Ein Einbau von ^3H -Thymin in die Rattenepidermis unter den Bedingungen der Raumtemperatur ($+20^\circ \text{C}$) war bei abnehmender Tendenz über 24 Stunden zu verfolgen (SCHELLMANN und SCHELL 1980).

An der menschlichen Epidermis fand man, daß eine Inkorporationsaktivität bei Raumtemperatur bis zu einem Zeitraum von etwa 36 Stunden nachzuweisen war, bei Kühlung ($+4^\circ \text{C}$) der Haut aber über 96 Stunden anhielt (SCHELLMANN 1981).

Ähnliche Ergebnisse erhielt man auch für die Mundschleimhaut von Ratte und Mensch.

2. AUFGABENSTELLUNG

Bei allen diesen vorgenannten histoautoradiographischen Untersuchungen wurde das Hautmaterial in situ entnommen und anschließend sofort in ein geeignetes Inkubationsmedium überführt. In der gerichtsmedizinischen Praxis wird dagegen ein direktes Einbringen asservierter Hautstanzen in den Untersuchungsgang in der Regel nicht unmittelbar durchführbar sein.

Wir wollten deshalb der Frage nachgehen, inwieweit eine Asservierung frisch entnommener Hautproben über 24 Stunden möglich ist und ob sich derartige Hautbiopsate noch nach 24-stündiger Konservierung untersuchen lassen. Nach Angaben aus der Literatur wurden einfache und praxisgerechte Konservierungsmethoden ausgewählt.

Ziel dieser Arbeit sollte deshalb sein, an der Rattenhaut zu überprüfen, inwieweit die verschiedenen Bedingungen der Lagerung in situ entnommener Hautproben Einfluß auf die Inkorporationsaktivität von ^3H -Thymidin in die Epidermis ausüben und welche Art der Konservierung über 24 Stunden sich in der Praxis als am günstigsten erweist.

3. MATERIAL UND METHODE

3.1 Versuchsmaterial und -bedingungen

Für den Versuch standen zwei 6 Monate alte WISTAR-Albinoratten eines Inzuchtstamms zur Verfügung, die zu einem definierten Zeitpunkt durch Genickschlag betäubt und dekapitiert wurden. Die Rückenhaut beider Labortiere wurde rasiert. Um ein Austrocknen der Haut zu verhindern, befanden sich die Kadaver während des Versuchszeitraums von 24 Stunden in einer feuchten Kammer bei etwa konstanter Umgebungstemperatur von $+20^{\circ}\text{C}$.

3.2 Materialentnahme, Lagerungsbedingungen

Aus der Haut jeder Ratte wurden jeweils 3 Doppelstanzen zum Zeitpunkt 0 (Dekapitation) und dann in vierstündlichen Abständen bis zur 24. Stunde post decapitationem simultan entnommen. Gewonnen wurden die Biopsate mit einem Stanzmesser von 3 mm Durchmesser (BIOPSIE PUNCH, STIEFEL-LABORATORIUM GmbH, Offenbach).

Für die Aufbewahrung der Hautstanzen in der Versuchsreihe mit Medium wählten wir eines, das verbreitet und leicht erhältlich ist (MEDIUM 199, modifiziert mit EARLE's Salzen mit 20 mM HEPES-PUFFER [HEPES = N-2-Hydroxyäthylpiperazin-N'-2-Äthansulfonsäure], FLOW LABORATORIES, U.K.). Entsprechend den gewählten Konservierungsbedingungen wurden jeweils eine Hautstanze (zusammen mit einer Kontrollstanze) gemäß folgender Aufstellung aufbewahrt:

VERSUCHSREIHE 1 ($+4^{\circ}\text{C}$, kein Medium)

Einbringen der Stanzen in 2 x 3 cm messende, verschließbare Polyäthylenbeutel ohne Zusatz eines Mediums, Konservierung über 24 Stunden bei $+4^{\circ}\text{C}$.

(Entsprechende Benennung der Hautproben, z. B. für Ratte A:

4 A 0, 4 A 4, 4 A 8..., wobei die Ziffer vor A die Konservierungstemperatur, die Ziffer hinter A den Entnahmepunkt nach Dekapitation in Stunden festlegt.)

VERSUCHSREIHE 2 (+4° C, Medium)

Einbringen der Stenzen in 2 x 3 cm messende, verschließbare Polyäthylenbeutel,

Zusatz von je 0.5 ml MEDIUM 199,

Konservierung über 24 Stunden bei +4° C.

(Nomenklatur entsprechend, z. B. für Ratte A: M4 A 0, M4 A 4..., M für Medium.)

VERSUCHSREIHE 3 (-18° C, kein Medium)

Einbringen der Stenzen in 2 x 3 cm messende, verschließbare Polyäthylenbeutel ohne Zusatz eines Mediums,

Konservierung über 24 Stunden bei -18° C.

(Nomenklatur entsprechend, z. B. für Ratte A: 18 A 0, 18 A 4...)

3.3 Histoautoradiographische Technik

Nach Ablauf der Konservierung wurden die Hautstanzen (einschließlich der Kontrollstanzen) aller Versuchsreihen in PYREX-Schraubkapseln überführt, die mit je 5 ml auf +37° C vorgewärmtem MEDIUM 199 unter Zusatz von ³H-Thymidin in der Konzentration von 5 µCi/ml (spezifische Aktivität 6 Ci/mM, AMERSHAM-BUCHLER, Braunschweig) beschickt waren. Die anschließende Inkubation wurde im Wasserbad bei einer konstanten Temperatur von +37° C über 60 Minuten durchgeführt. Nach Entnahme der Stenzen (auch der Kontrollstanzen) erfolgte die Fixation in CARNOY-Lösung (60 % abs. Äthanol, 30 % Chloroform, 10 % Eisessig).

Die Proben wurden in einer aufsteigenden Alkoholreihe (90 % Äthanol 2 x 2 Stunden, 96 % Äthanol 2 x 2 Stunden, 100 %

Äthanol 3 x 12 Stunden) entwässert, danach für 3 x 8 Stunden in Methylbenzoat und für 2 x 15 Minuten in Benzol eingelegt. Danach kamen die Präparate für 3 Stunden in eine gesättigte Lösung von Benzolparaffin von +30° C bis +40° C und wurden dann in reines Paraffin (HISTOPLAST, SERVA, Heidelberg) übertragen.

Nach dieser Einbettung wurden von jeder Stanze 60 bis 80 Serienschnitte senkrecht zur epidermalen Oberfläche hergestellt. Die Schnitte - Schichtdicke etwa 5 μm - wurden auf mit Chromgelatine beschichtete Objektträger gebreitet, mit Xylol entparaffiniert und über eine absteigende Alkoholreihe in aqua dest. eingebracht. In der Dunkelkammer wurde der Film (AR 10 KODAK) nach dem STRIPPING-Verfahren auf die Objektträger aufgezogen. Die empirisch ermittelte Expositionszeit des Films betrug 10 Tage bei +4°C. Anschließend wurde das histautoradiographische Präparat entwickelt, mit saurem Hämalaun (nach MAYER) gefärbt, in einer aufsteigenden Alkoholreihe entwässert und mit Eukitt eingedeckt.

Der STRIPPING-Film AR 10 eignet sich für quantitative histautoradiographische Arbeiten wegen der konstanten Dicke der Photoemulsionsschicht (5 $\mu\text{m} \pm 0.5$ Photoemulsion auf 10 μm dicker Gelatineträgersubstanz). Mit einer Kristallgröße von durchschnittlich 0.2 μm besitzt der Film ausreichende Empfindlichkeit und hohes Auflösungsvermögen (SCHELL 1978).

3.4 Auswertung der Schnitte

Denjenigen Zellkernen, die während der DNS-Synthesephase im Zellzyklus den β -Strahler ^3H -Thymidin inkorporiert hatten, ließ sich in der photographischen Schicht über dem Zellkern eine feinkörnige Schwärzung zuordnen. In der Auswertung galten nur Kerne mit mindestens 4 Silberkörnern als markiert.

Über ein ZEISS Mikroprojektionsgerät mit Ölimmersionsobjektiv (Vergrößerung 500 fach) wurden zunächst Verlauf und

Länge der Basalmembran sowie die markierten Zellkerne der einzelnen Serienschnitte zeichnerisch dargestellt und so belegt. Um zu vermeiden, daß eine doppelte Zählung derselben Zellen erfolgte, wurde nur jeder dritte Schnitt ausgewertet. Waren gelegentlich Abschnitte der Einzelschnitte durch Artefakte beeinträchtigt, blieben sie ebenfalls unberücksichtigt.

Als Maß der Proliferationsaktivität der Epidermis wurde zunächst für alle Serienschnitte der Einbauquotient aus der Anzahl der markierten Zellkerne pro 100 μ m Länge der Basalmembran bestimmt.

Das experimentelle Vorgehen ist zusammenfassend in Abb. 1 dargestellt.

Versuchsreihe	1	2	3
Bezeichnung (z.B. für Ratte A)	4 A	M4 A	18 A
Stanzennahme in vierstündigen Intervallen	4 A 0, 4 A 4, 4 A 8...	M4 A 0, M4 A 4, M4 A 8...	18 A 0, 18 A 4, 18 A 8...



Konservierung:

Medium

Ø

MEDIUM
199

Ø

Lagertemperatur
über 24 Std.

+4°C

+4°C

-18°C

Inkubation:

MEDIUM 199 +
Aktivität bei
37°C über 1 Std.



Herstellung der
histoautoradio-
graphischen
Präparate



Projektion und
Auswertung der
Präparate

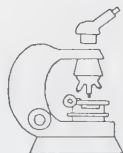


Abb. 1: Schematische Darstellung der Gewinnung der Hautbiopsien, Lagerungsbedingungen, Herstellung und Auswertung der Histoautoradiogramme

4. ERGEBNISSE

Alle angefertigten Histoautoradiogramme wiesen eine blaßblaue Färbung der Kerne auf. Die Silberkornmarkierung war im allgemeinen gut abgrenzbar und den Kernen zuzuordnen. Nulleffekte, die bei der Auswertung hätten stören können, traten nicht auf.

Die Inkorporationsraten des ^3H -Thymidins wurden einmal als Durchschnittswerte der oben angegebenen Quotienten (= arithmetisches Mittel der Einbauquotienten der Einzelschnitte jeder Hautstanze) angegeben, in den Abb. 2, 4 und 5 graphisch als schwarze Säulen dargestellt. Wegen der starken Längenabweichungen der einzelnen Schnitte untereinander erschien es angebracht, die Einzelschnitte durch einen Korrekturfaktor (proportional zur Länge) zu wichten. Es wurden daher weiter Mittelwerte als Quotienten aus der Gesamtzahl der markierten Zellkerne $\times 100$ pro Gesamtlänge der Basalmembran aller Schnitte einer Stanze angegeben und in den Abb. 2, 4 und 5 graphisch als weiße Säulen abgetragen.

Die Einbauaktivitäten der Einzelschnitte können schwanken. Exemplarisch wird daher die Verteilung und Streuung der Inkorporationsaktivitäten der Einzelschnitte in der 4 Stunden post mortem gewonnenen Stanzprobe, jeweils für Ratte A und B, in Form eines Stabdiagramms demonstriert (Abb. 3).

4.1 Inkorporationsraten nach Lagerung bei $+4^{\circ}\text{C}$ ohne Medium (Versuchsreihe 1)

Diese Auswertung der Säulendiagramme der Versuchsreihe 1 zeigt bei beiden Ratten anfänglich relativ hohe ^3H -Thymidin-Einbauraten (Abb. 2).

Bei Versuchstier A kann man im Diagramm einen etwa line-

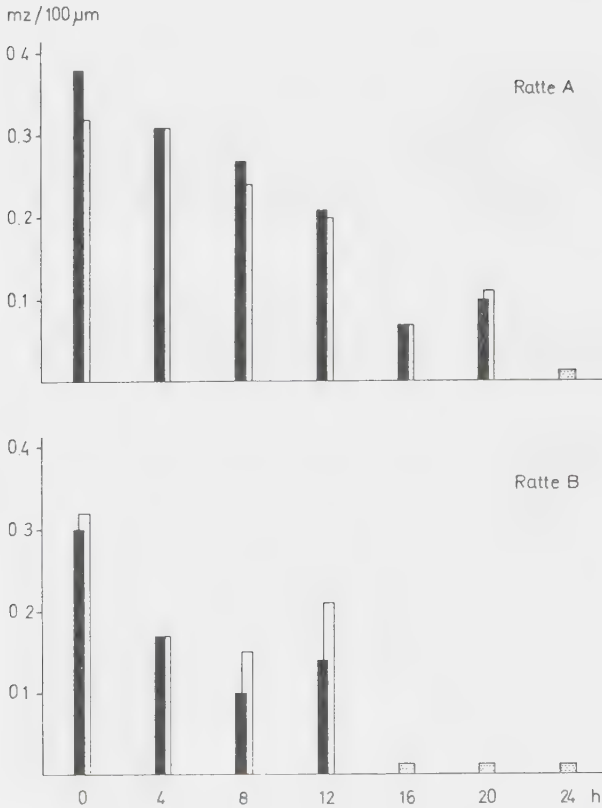


Abb. 2: Rattenepidermis - Konservierung über 24 Stunden bei +4° C ohne Medium (Versuchsreihe 1).

Durchschnittliche Anzahl ^3H -Thymidin-markierter Zellkerne pro 100 μm Länge der Basalmembran ($\text{mz}/100 \mu\text{m}$) in Abhängigkeit vom Todeszeitpunkt. Die weißen Säulen stellen die Quotienten aus der Gesamtzahl der markierten Zellkerne $\times 100$ pro Gesamtlänge der Basalmembran aller Schnitte einer Stanze dar, die schwarzen Säulen stehen für das arithmetische Mittel der Einbauquotienten der Einzelschnitte. Die gepunkteten Säulen deuten nachweisbare Einbauaktivitäten im Serienschnitt an, die jedoch die Zahl von 7 (Ratte A) bzw. 6 (Ratte B) markierten Zellkernen pro Stanze nicht überschritten.

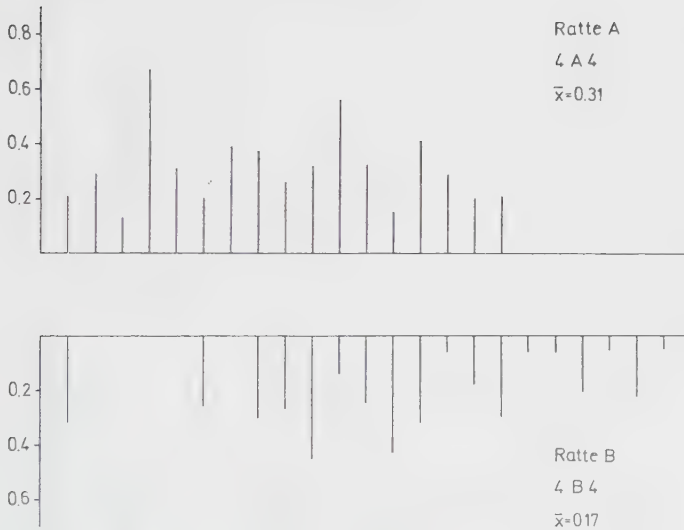


Abb. 3: Stabdiagramme - Rattenepidermis

Darstellung der Verteilung der Einzelwerte ($\text{mz}/100\mu\text{m}$) der ausgewerteten Serienschritte, exemplarisch für die 4 Stunden post decapitationem entnommenen Hautstanzen der Versuchsreihe 1. Oben (Ratte A) wurden 17, unten (Ratte B) 23 Serienschritte ausgewertet; davon waren bei Ratte B 5 Einzelschnitte Nullwerte. $\bar{x}$ = Mittelwerte der ^3H -Thymidin-Einbauraten.

aren Abfall der ^3H -Inkorporation in die Epidermis über den Versuchszeitraum von 24 Stunden verfolgen. Die Quotienten der Einbauaktivitäten liegen anfangs bei 0.3 bzw. 0.4 mZ/100 μm und sind nach 24 Stunden fast auf Null abgefallen.

Der Einbau markierten Nukleosids liegt beim zweiten Versuchstier (Ratte B) ähnlich verteilt und in gleichen Größenordnungen. Allerdings verläuft die Inkorporation ungleichmäßiger, beim 16-Stunden-Wert zeigt sich ein starker Abfall. Bis zu Versuchsende bleiben die Einbauaktivitäten zwar nachweisbar, aber auf niedrigem Niveau. In allen diesen ausgewerteten Serienschnitten überschreiten sie nicht die Zahl von 7 (Ratte A) bzw. 6 (Ratte B) markierten Zellkernen (gepunktete Säulen im Diagramm Abb. 2).

4.2 Inkorporationsraten nach Lagerung bei $+4^\circ\text{C}$ im Medium (Versuchsreihe 2)

Abb. 4 stellt die Inkorporation radioaktiver Substanz in die Rattenepidermis nach Konservierung über 24 Stunden bei $+4^\circ\text{C}$ in MEDIUM 199 dar. Es handelt sich wieder um gemittelte Werte. Die Stanzproben beider Versuchstiere zeigen zunächst kräftige Einbauraten mit abfallender Tendenz.

Die ^3H -Thymidin-Inkorporation in die Epidermis von Versuchstier A liegt anfangs in der bekannten Größenordnung von 0.3 mZ/100 μm , fällt jedoch bei 12 Stunden wieder stark ab. Bis zum Versuchsende ist zu jedem Zeitpunkt Einbauaktivität nachweisbar, die außer beim 16-Stunden-Wert (0.05 mZ/100 μm) nie mehr als 9 (Ratte A) bzw. 11 (Ratte B) markierte Zellkerne in allen ausgewerteten Serienschnitten umfaßt.

Bei Ratte B zeigt sich ein angedeutet wellenförmiger Verlauf der Stoffwechselaktivität mit einem Anfangswert, der wieder bei 0.4 mZ/100 μm liegt und nach 12 Stunden post mortem nochmals einen Einbauquotienten von 0.2 erreicht.

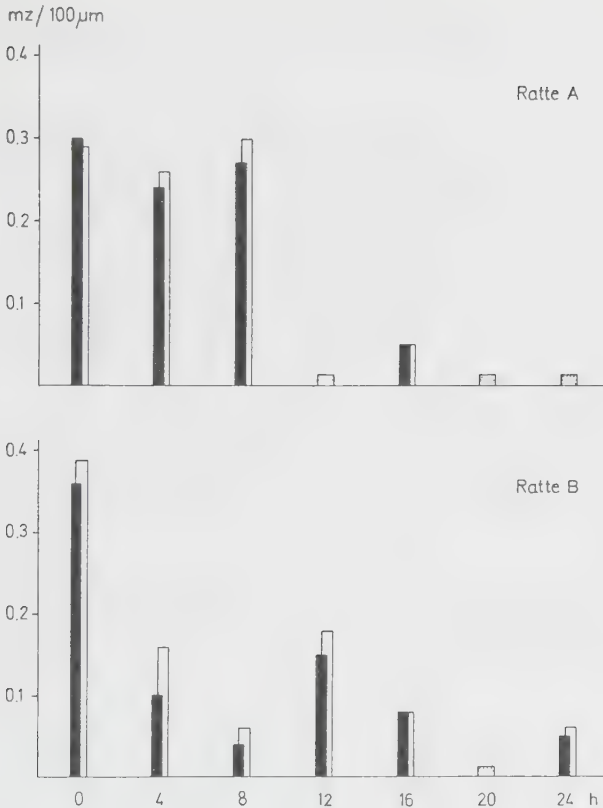


Abb. 4: Rattenepidermis - Konservierung über 24 Stunden bei +4°C in MEDIUM 199 (Versuchsreihe 2).

Durchschnittliche ^3H -Thymidin-Einbauraten (mz/100 µm) in Abhängigkeit vom Todeszeitpunkt. Die weißen Säulen bezeichnen die Quotienten aus der Gesamtzahl der markierten Zellkerne x 100 pro Gesamtlänge der Basalmembran, die schwarzen Säulen den Durchschnittswert der Einbauquotienten der Einzelschnitte. Die gepunkteten Säulen stehen für nachweisbare Einbauaktivitäten im Serienschnitt, die jedoch die Zahl von 9 (Ratte A) bzw. 11 (Ratte B) markierten Zellkernen pro Stanze nicht überschritten.

4.3 Inkorporationsraten nach Lagerung bei -18°C ohne Medium (Versuchsreihe 3)

In der Versuchsreihe 3, Aufbewahrung der Hautstanzen bei -18°C , liegen bei der ersten Ratte schon zu den Untersuchungszeitpunkten 0 bzw. 4 geringere Einbauraten vor, die nicht einmal ein Viertel des gewohnten Inkorporationsniveaus erreichen (ca. 0.06). Schon nach 8 Stunden ist nur noch eine minimale Aktivität bis zu Versuchsende nachzuweisen (maximal 5 markierte Zellkerne/Stanze).

Auch bei der zweiten Ratte ist die Inkorporationsaktivität von Anfang an minimal, lediglich bei dem 12-Stunden-Wert ist ein "normaler" Einbauquotient in der Größenordnung von 0.1 zu verzeichnen.

Weder in der ersten Hautstanze noch in der Kontrollstanze des 16-Stunden-Zeitpunkts ist eine Inkorporationsaktivität nachweisbar (Abb. 5).

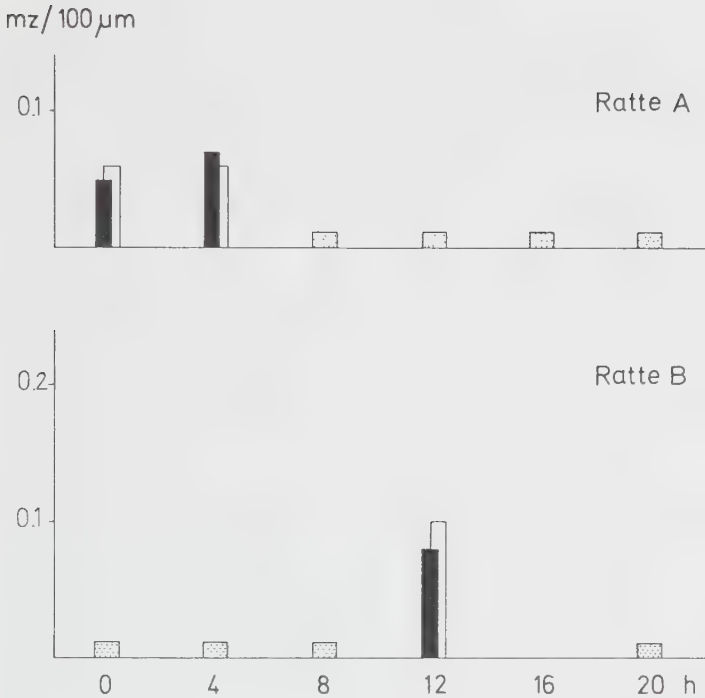


Abb. 5: Rattenepidermis - Konservierung über 24 Stunden bei -18°C ohne Medium (Versuchsreihe 3). Durchschnittliche ^3H -Thymidin-Einbauraten (mz/100 μm) in Abhängigkeit vom Todeszeitpunkt. Die gepunkteten Säulen bezeichnen nachweisbare Einbauaktivitäten im Serienschchnitt, die jedoch die Zahl von 5 markierten Zellen pro Stanze nicht überschritten.

5. DISKUSSION

Ziel dieser Untersuchung war, zunächst an der Rattenepidermis zu prüfen, inwieweit am postmortal entnommenen Hautgewebe nach 24-stündiger Lagerung der Einbau von ^3H -Thymin in die Zellkerne histoautoradiographisch verfolgt werden kann. Dabei wurden drei unterschiedliche Asservierungsbedingungen für die Hautstanzen gewählt und die Proliferationsaktivität in Abhängigkeit vom Todeszeitpunkt durch die Thyminmarkierung erfaßt.

Die Ergebnisse sollten dann den Einbauraten von ^3H -Thymin aus früheren Untersuchungen gegenüber gestellt werden, bei denen die postmortal entnommenen Hautbiopsien ohne Lagerung, also unmittelbar nach deren Entnahme, in den Untersuchungsgang eingebracht wurden.

Bei der Methode der Gefrieraufbewahrung unter Verwendung kryoprotektiver Substanzen sind sehr niedrige Lagertemperaturen erforderlich, um den Gewebsstoffwechsel vorübergehend stillzulegen. Diese für viele Problemstellungen grundsätzlich optimale Methodik ist technisch sehr aufwendig und erschien uns im Hinblick auf eine Anwendbarkeit in der Praxis nicht durchführbar.

Aus dem Studium der Literatur über Konservierungsmethoden ergaben sich eine ganze Reihe etwas unterschiedlicher Aufbewahrungsverfahren, die aber mehr oder weniger alle zu günstigen Ergebnissen führen. Für einen eher kurzfristigen Konservierungszeitraum, wie wir ihn mit 24 Stunden festlegten, eignen sich daher Temperaturen, die wenig über dem Gefrierpunkt, am besten bei $+4^{\circ}\text{C}$ bis $+5^{\circ}\text{C}$ liegen. Untersuchungen, z. B. an menschlicher Hornhaut, ergaben, daß der Gewebsstoffwechsel unter diesen Temperaturen stark verlangsamt ist (McCAREY und KAUFMAN 1974). Ein Gefrierschaden durch intra- oder interzelluläre Eisbildung ist bei Temperaturen bis -3°C noch ausgeschlossen ("Phase der Unterkühlung"), unter der

Voraussetzung, daß ein Medium mit puffernden Eigenschaften zur Verwendung kommt (DE LOECKER 1974).

Eine Lagerungstemperatur von $+4^{\circ}\text{C}$, wie man sie mit jedem normalen Kühlschrank erreichen kann, bot sich daher als Asservierungstemperatur an. Die meisten Autoren verwenden für eine Konservierung von Geweben bei Temperaturen über 0°C nutritive Medien, die für die Zelle ein "physiologisches" Milieu darstellen und eine Versorgung mit Kohlenhydraten und Aminosäuren sicherstellen. Dadurch werden stärkere Konzentrationsgradienten an den Zellmembranen verhindert, sowie auch der intrazelluläre pH-Wert in etwa konstant gehalten. Das von uns verwendete MEDIUM 199 gehört zu dieser Gruppe (Glukosekonzentration 1000 mg/l).

Einer Aufbewahrung der Hautstanzen unter den Bedingungen eines üblichen "Tiefkühlfaches", also bei etwa -18°C , mußte man dagegen von vornherein skeptisch gegenüberstehen, da bei Nichtverwendung kryoprotektiver Substanzen die Gefahr eines Gefrierschadens besteht.

Wie man schon in früheren Untersuchungen sehen konnte, wurden an den Serienschnitten keine verminderten ^3H -Thymidin-Einbauraten in den randnahen Abschnitten der Hautstanzen beobachtet. Das spricht für die Pionsiegegwinnung durch Stanzung als ein relativ schonendes Verfahren, bei denen auch die randnahen Zellen nicht wesentlich traumatisiert werden. Weiter kann man davon ausgehen, daß ein wesentlicher konkurrierender Effekt der Autolyse auch zu den Diffusionsvorgängen während der einstündigen Inkubationszeit nicht auftritt (SCHELLMANN 1981).

Die Ergebnisse dieser Untersuchung zeigen zunächst, daß auch nach Asservierung isolierter Hautstanzen über 24 Stunden eine Inkorporationsaktivität in der Rattenepidermis nachzuweisen ist. Sowohl mit und ohne Medium ergeben sich Einbauraten für ^3H -Thymidin, die für die ersten Stunden post mortem

die höchsten Werte erreichen, später abfallen und über einen Zeitraum von 24 Stunden zu verfolgen sind. Dabei liegen die Einbauraten, die auf die Durchschnittswerte der proportional ihrer Länge unkorrigierten Einbauquotienten der Einzelschnitte bezogen sind, in den gleichen Größenordnungen wie die, bei denen der Quotient aus der Gesamtzahl der markierten Zellkerne $\times 100$ pro Gesamtlänge der Basalmembran gebildet wird. Sie bewegen sich anfangs zwischen 0.3 bis 0.4, also auf der gleichen Höhe, wie sie auch für nichtgelagerte Stanzbiopsien an der Rattenhaut gefunden wurden (SCHELLMANN und SCHELL 1980). Dabei wird man aufgrund der vorliegenden Ergebnisse davon ausgehen müssen, daß die Konservierung bei $+4^{\circ}\text{C}$ mit und ohne Medium gleichwertig anzusehen ist.

Wie schon früher beobachtet, fiel auch in diesen Untersuchungen mit 24 Stunden lang aufbewahrten Hautstückchen eine Unregelmäßigkeit in der zeitlichen Abfolge der ^3H -Thymidin-Inkorporationsraten auf. Während man bei dem Versuch 1 (Ratte A) ohne Medium noch von einem linearen Abfall der Einbauraten sprechen kann (s. Abb. 2 oben), zeigen die anderen Diagramme eher einen wellenförmigen Verlauf der Einbauaktivitäten, ein Phänomen, das an der Rattenhaut, aber auch an menschlicher Epidermis und Mundschleimhaut zu beobachten war (SCHELLMANN 1981). Über die Ursache dieser Schwankungen der Einbauaktivität kann man nur Vermutungen anstellen: zu diskutieren sind wohl weniger methodische Schwankungen (SCHELL 1978), sondern wechselnde Aktivitäten der kontinuierlichen Mauserung im begrenzten Hautareal (BECK 1971) und, in Abhängigkeit vom Lebensalter der Tiere, topische Unterschiede der Zellproliferation (KIRSCHNER 1968). Diese nicht unbeachtlichen Schwankungen der Einbauraten zwischen zeitlich benachbarten Proben basieren möglicherweise auch auf Änderungen im Stoffwechsel der Zelle nach dem Wegfall übergeordneter (neurogener, humoraler) und/oder lokaler, gewebe-eigener Steuermechanismen (Chalone) der epidermalen Proliferation. Über den Einfluß der mitosehemmenden Gewebshormone oder zyklischen Nukleotide auf die postmortalen Zykklus-

schwankungen ist noch wenig bekannt.

Im Gegensatz zu den Versuchsreihen 1 und 2, die ordentliche Einbauaktivitäten aufweisen, ist das Ergebnis der Versuchsreihe 3 unbefriedigend. Bei beiden Versuchstieren wurde überhaupt nur zu drei Zeitpunkten eine regelrechte Einbauaktivität festgestellt, die zudem noch auf deutlich erniedrigtem Niveau stattfand. Offenbar kam es hier beim Einfrieren der Stansen zu Gefrierschäden, da ein kryoprotektiver Zusatz, etwa von glyzerinhaltigen Lösungen, wie ihn Autoren für Aufbewahrungstemperaturen auch von -20°C empfehlen (GEORGIADÉ 1956), fehlte. Möglicherweise spielen aber auch technische Mängel für dieses unbefriedigende Ergebnis eine Rolle (Schwierigkeiten bei der Einbettung, Auftauschwindigkeit?).

Abschließend wird man sagen können, daß der Nachweis einer Inkorporation von ^3H -Thymidin an Hautstanzen auch nach einem Lagerungszeitraum von 24 Stunden bei $+4^{\circ}\text{C}$ noch gelingt. Dabei erscheint es nicht entscheidend, ob man die Hautbiopsien mit oder ohne Medium aufbewahrt.

Aufgrund der Unregelmäßigkeiten im Verlauf der postmortalen Einbauraten, die den Ergebnissen früherer Untersuchungen entsprechen, erscheint für eine praktische forensische Anwendbarkeit in Hinblick auf eine Bestimmung des Todeszeitpunktes (frühes postmortales Intervall beim Menschen) Zurückhaltung geboten.

die höchsten Werte erreichen, später abfallen und über einen Zeitraum von 24 Stunden zu verfolgen sind. Dabei liegen die Einbauraten, die auf die Durchschnittswerte der proportional ihrer Länge unkorrigierten Einbauquotienten der Einzelschnitte bezogen sind, in den gleichen Größenordnungen wie die, bei denen der Quotient aus der Gesamtzahl der markierten Zellkerne $\times 100$ pro Gesamtlänge der Basalmembran gebildet wird. Sie bewegen sich anfangs zwischen 0.3 bis 0.4, also auf der gleichen Höhe, wie sie auch für nichtgelagerte Stanzbiopsien an der Rattenhaut gefunden wurden (SCHELLMANN und SCHELL 1980). Dabei wird man aufgrund der vorliegenden Ergebnisse davon ausgehen müssen, daß die Konservierung bei $+4^{\circ}$ C mit und ohne Medium gleichwertig anzusehen ist.

Wie schon früher beobachtet, fiel auch in diesen Untersuchungen mit 24 Stunden lang aufbewahrten Hautstückchen eine Unregelmäßigkeit in der zeitlichen Abfolge der ^3H -Thymidin-Inkorporationsraten auf. Während man bei dem Versuch 1 (Ratte A) ohne Medium noch von einem linearen Abfall der Einbauraten sprechen kann (s. Abb. 2 oben), zeigen die anderen Diagramme eher einen wellenförmigen Verlauf der Einbauaktivitäten, ein Phänomen, das an der Rattenhaut, aber auch an menschlicher Epidermis und Mundschleimhaut zu beobachten war (SCHELLMANN 1981). Über die Ursache dieser Schwankungen der Einbauaktivität kann man nur Vermutungen anstellen: zu diskutieren sind wohl weniger methodische Schwankungen (SCHELL 1978), sondern wechselnde Aktivitäten der kontinuierlichen Mauserung im begrenzten Hautareal (BECK 1971) und, in Abhängigkeit vom Lebensalter der Tiere, topische Unterschiede der Zellproliferation (KIRSCHNER 1968). Diese nicht unbedeutlichen Schwankungen der Einbauraten zwischen zeitlich benachbarten Proben basieren möglicherweise auch auf Änderungen im Stoffwechsel der Zelle nach dem Wegfall übergeordneter (neurogener, humoraler) und/oder lokaler, gewebe-eigener Steuermechanismen (Chalone) der epidermalen Proliferation. Über den Einfluß der mitosehemmenden Gewebshormone oder zyklischen Nukleotide auf die postmortalen Zyklus-

schwankungen ist noch wenig bekannt.

Im Gegensatz zu den Versuchsreihen 1 und 2, die ordentliche Einbauaktivitäten aufweisen, ist das Ergebnis der Versuchsreihe 3 unbefriedigend. Bei beiden Versuchstieren wurde überhaupt nur zu drei Zeitpunkten eine regelrechte Einbauaktivität festgestellt, die zudem noch auf deutlich erniedrigtem Niveau stattfand. Offenbar kam es hier beim Einfrieren der Stenzen zu Gefrierschäden, da ein kryoprotektiver Zusatz, etwa von glyzerinhaltigen Lösungen, wie ihn Autoren für Aufbewahrungstemperaturen auch von -20°C empfehlen (GEORGIADÉ 1956), fehlte. Möglicherweise spielen aber auch technische Mängel für dieses unbefriedigende Ergebnis eine Rolle (Schwierigkeiten bei der Einbettung, Auftaugeschwindigkeit?).

Abschließend wird man sagen können, daß der Nachweis einer Inkorporation von ^3H -Thymidin an Hautstanzen auch nach einem Lagerungszeitraum von 24 Stunden bei $+4^{\circ}\text{C}$ noch gelingt. Dabei erscheint es nicht entscheidend, ob man die Hautbiopsien mit oder ohne Medium aufbewahrt.

Aufgrund der Unregelmäßigkeiten im Verlauf der postmortalen Einbauraten, die den Ergebnissen früherer Untersuchungen entsprechen, erscheint für eine praktische forensische Anwendbarkeit in Hinblick auf eine Bestimmung des Todeszeitpunktes (frühes postmortales Intervall beim Menschen) Zurückhaltung geboten.

6. ZUSAMMENFASSUNG

Im Rahmen von Untersuchungen zum "postmortalen" Stoffwechselverhalten von Hautgewebe sollte geprüft werden, inwieweit in situ entnommene Haut dekapitierter Ratten über einen Zeitraum von 24 Stunden asserviert werden kann und ob solche Hautproben unter Anwendung der histoautoradiographischen Untersuchungstechnik noch nach 24-stündiger Konservierung unter verschiedenen Konditionen bezüglich ihrer Stoffwechselaktivität auswertbar sind.

Dazu wurden Biopsien aus der Rückenhaut zweier dekapitierter Laborratten zum Zeitpunkt des Todes und nachfolgend in vierstündlichen Abständen über einen Zeitraum bis zu 24 Stunden gewonnen und in drei Versuchsreihen bei Temperaturen von $+4^{\circ}\text{C}$ ohne bzw. mit Zusatz von MEDIUM 199 sowie bei -18°C ohne Zusatz eines Mediums über jeweils 24 Stunden gelagert.

Der Einbau einer radioaktiv markierten Vorläufersubstanz - des Nukleosids ^3H -Thymidin - in die Rattenepidermis wurde in Abhängigkeit vom zeitlichen Intervall zwischen Dekapitation und Zeitpunkt der Probennahme in situ bestimmt. Die Inkorporationsraten von ^3H -Thymidin (angegeben als arithmetisches Mittel der Einzeldurchschnitte und als Quotient aus der Gesamtzahl der markierten Zellkerne $\times 100$ pro Gesamtlänge der Basalmembran aller Einzelschnitte) der einzelnen Versuchsreihen wurden miteinander verglichen.

Als wesentliches Ergebnis darf angegeben werden, daß die Methode der einfachen Kühlung der Gewebeproben bei $+4^{\circ}\text{C}$ unter Verzicht auf ein Medium ausreicht, um die in situ entnommenen Biopsate über einen Zeitraum bis zu etwa 12 Stunden nach dem Tod wirksam zu konservieren, d. h. daß die Gewebeproben in diesem Intervall autoradiographisch gut verfolgbare, relativ steil linear abfallende Inkorporationsraten in der Größenordnung von 0.4 bis 0.2 markierte Zellkerne pro 100 μm Länge der Basalmembran aufweisen.

Aufgrund des wellenförmigen Verlaufs der postmortalen Einbauraten, der den Ergebnissen früherer Untersuchungen entspricht, erscheint für eine praktische forensische Anwendbarkeit in Hinblick auf eine Bestimmung des Todeszeitpunktes (frühes postmortales Intervall beim Menschen) Zurückhaltung geboten.

7. LITERATURVERZEICHNIS

ABBOTT, W. M., PAPPAS, A. M.

Comparative Studies on Fresh and Preserved Skin: Fundamental Biologic Differences in Behavior as Grafts
Ann. Surg. 172: 781-86 (1970)

AMLACHER, E.

Autoradiographie in Histologie und Cytologie
Fischer, Stuttgart 1974

AQUAVELLA, J. V., VAN HORN, D. L., HAGGERTY, C. J.

Corneal Preservation Using M-K-Medium
Am. J. Ophthalmol. 80: 791-99 (1975)

BARLYN, L. W., BERGGREN, R. B., LEHR, H. B.

Frozen Skin Autografts Protected by Dimethyl Sulfoxide
Surg. Forum 15: 475-77 (1964)

BECK, B.

Experimentelle Untersuchungen des supravitalen Sauerstoffverbrauchs der Rattenhaut in Abhängigkeit vom Haarzyklus
Med. Diss. Göttingen (1971)

BERGGREN, R. B., LEHR, H. B.

Clinical Use of Viable Frozen Human Skin
J. A. M. A. 194: 149-51 (1965)

BIAGINI, G., POPPI, V., COCCHIA, D., RUBOLI, G., DAMIANI, R., LASCHI, R.

Skin Storage in Liquid Nitrogen. An Ultrastructural Investigation
J. Cutan. Pathol. 6: 5-17 (1979)

BIGAR, F., McCAREY, B. E., KAUFMAN, H. E.

Improved Corneal Storage: Penetrating Keratoplasties in Rabbits

Exp. Eye Res. 20: 219-22 (1975)

BOREN, C. H., ROON, A. J., MOORE, W. S.

Maintenance of Viable Arterial Allografts by Cryopreservation

Surgery 83: 382-91 (1978)

BRIGHTON, C. T., SHADLE, C. A., JIMENEZ, S. A., IRWIN, J. T., LANE, J. M., LIPTON, M.

I. Articular Cartilage Preservation and Storage. Application of Tissue Culture Techniques to the Storage of Viable Articular Cartilage

Arthritis Rheum. 22: 1093-101 (1979)

CAPELLA, J. A., KAUFMAN, H. E., ROBBINS, J. E.

Preservation of Viable Corneal Tissue

Cryobiology 2: 116-21 (1965)

CARREL, A.

The Preservation of Tissues and Its Application in Surgery

J. A. M. A. 59: 523-27 (1912)

DE LOECKER, W., DOMS, D., STAS, M. L., VERSTREKEN, J.

Metabolic Changes in Ratskin Stored in Buffer Medium at -3° C
Cryobiology 11: 359-65 (1974)

DE LOECKER, W., DE WEVER, F., JULLET, R., STAS, M. L.

Metabolic Changes in Rat Skin during Preservation and Storage in Glycerol Buffer at -196° C

Cryobiology 13: 24-30 (1976)

DE LOECKER, W., DE WEVER, F., STAS, M. L., JULLET, R.
The Effects of Adenosine Triphosphate and Inorganic Phosphates on the Viability of Stored Rat Skin
Cryobiology 16: 11-17 (1979)

FRIEDLAND, B. R., FORSTER, R. K.
Comparison of Corneal Storage in McCarey-Kaufman Medium, Moist Chamber, or Standard Eye-Bank Conditions
Invest. Ophthalmol. 15: 143-47 (1976)

GEORGIADÉ, N., PESCHEL, E., GEORGIADÉ, R., BROWN, I.
A Clinical and Experimental Investigation of the Preservation of Skin
Plast. Reconstr. Surg. 17: 267-75 (1956)

KAPLAN, A. V., MAKHSON, N. E., FEYGELMAN, S. S., MARKOVA, O. N., KHUDAYDATOV, I. S., URAZGILDEEV, Z. I., SVERDLOV, YU. M., GYULYAGOMEDOV, U. A.
Clinical Use of an Allogenic Skin Preserved in Formalin-Glycerol Solution and Subsequently Stored in Polyethylene Packages
Acta Chir. Plast. 21: 1-6 (1979)

KIRSCHNER, H.
Autoradiographische Untersuchungen über die Regeneration der Mundschleimhaut
Habil. Schrift Gießen (1968)

KUJAHARA, Y., SAKANQUE, M., HAYASHI, M., AKIYA, S., KOMOTO, M., KUMANOMIDO, A., OBAZAWA, H., NAKANO, T., HARA, T., KOMUKAI, M., SAGA, U., TAMURA, H., ISHIHARA, K., SHIMIZU, K., TAKEDA, K., OOSHIMA, T., OZAWA, H.
Studies on the Long Term Preservation of the Cornea for Penetrating Keratoplasty
Acta Soc. Ophthal. Jap. 69: 1751-1840 (1965)

LEHR, H. B., BERGGREN, R. B., LOTKE, P. A., CORIELL, L. L.
Permanent Survival of Preserved Skin Autografts
Surgery 56: 742-46 (1964)

MASCARELLA, K., CAVANAGH, H. D.
Penetrating Keratoplasty Using McCarey-Kaufman Preserved
Corneal Tissue
Southern Med. J. 72: 1268-71 (1979)

MCCAREY, B. E., KAUFMAN, H. E.
Improved Corneal Storage
Invest. Ophthalmol. 13: 165-73 (1974)

MEDAWAR, P. B.
The Storage of Living Skin
Proc. Roy. Soc. Med. 47: 62-64 (1954)

MIDER, G. B., MORTON, J. J.
The Effect of Freezing in Vitro on Some Transplantable
Mammalian Tumors and on Normal Rat Skin
Amer. J. Cancer 35: 502-9 (1939)

MIZUKAWA, T., MANABE, R.
Recent Advances in Keratoplasty with Special Reference
to the Advantage of Liquid Preservation
Folia Ophthal. Jap. 19: 1310-18 (1968)

NATHAN, P., ROBB, E. C., HARPER, A. D., BALLANTYNE, D. L.
Long-Term Skin Preservation by Combined Use of Tissue
and Freezing Techniques
Cryobiology 15: 133-41 (1978)

PERRY, V. P.
A Review of Skin Preservation
Cryobiology 3: 109-30 (1966)

POLGE, C., SMITH, A. U., PARKES, A. S.
Revival of Spermatozoa after Vitrification and
Dehydration at Low Temperatures
Nature 164: 666 (1949)

SAKIMOTO, T., VALENTI, J., ITOI, M., KAUFMAN, H. E.
Intermediate-Term Corneal Storage
Invest. Ophthalmol. 13: 219-28 (1974)

SHELL, H.
Biorhythmik und Epidermisproliferation
Grosse Scripta 4
Grosse Verlag Berlin 1978

SHELLMANN, B., SHELL, H.
Histoautoradiographische Untersuchungen zur postmortalen
Proliferation in der Epidermis der Ratte
Beitr. Ger. Med. XXXVIII: 199-201 (1980)

SHELLMANN, B.
Postmortaler Einbau von ^3H -Thymin in die Epidermis und
Mundschleimhaut des Menschen. Histoautoradiographische
Untersuchungen
Habil. Schrift Erlangen (1981)

SCHMIDT-MARTENS, F. W., HENNIGHAUSEN, U., WIRZ, K.,
TEFING, C.
Veränderungen im Stoffwechsel des Corneae epithels während
der mittelfristigen Hornhautkonservierung
Albrecht v. Graefes Arch. klin. exp. Ophthalm. 203: 145-52
(1977)

THOFT, R. A., FRIEND, J.
Corneal Epithelial Changes During Midterm Storage
Invest. Ophthalmol. 15: 82-88 (1976)

VALERI, C. R., FEINGOLD, H., MARCHIONNI, L. D.

A Simple Method for Freezing Human Platelets Using 6 % Dimethylsulfoxide and Storage at -80° C

Blood 43: 131-36 (1974)

VAN HORN, D. L., SCHULTZ, R. O., DEBRUIN, J.

Endothelial Survival in Corneal Tissue Stored in M-K-Medium
Am. J. Ophthalmol. 80: 642-47 (1975)

WALLER, W.

Gefrierkonservierung der Hornhaut

Klin. Mbl. Augenheilk. 163: 739-45 (1973)

WALLER, W. K., YOKOTA, S., LEYDHECKER, W.

Licht- und elektronenmikroskopische Untersuchungen an kurzzeitkonservierten Hornhäuten

Albrecht v. Graefes Arch. klin. exp. Ophthal. 199: 121-31
(1976)

WENTSCHER, J.

Ein weiterer Beitrag zur Überlebensfähigkeit der menschlichen Epidermiszellen

Deutsche Ztschr. f. Chir. 70: 21-44 (1903)

An dieser Stelle möchte ich Herrn Prof. Dr. H.-B. Wuer-
meling, dem Direktor des Instituts für Rechtsmedizin, für
die Arbeitsmöglichkeit an seinem Institut sowie für die
Übernahme des Korreferats danken.

Herrn Prof. Dr. O. P. Hornstein und Herrn Prof. Dr. H.
Schell bin ich für die Unterstützung dankbar, durch die
die Autoradiogramme in der Dermatologischen Universitäts-
klinik ausgewertet werden konnten.

Mein Dank gilt auch besonders Frau Möhrenschrager aus
dem Rechtsmedizinischen Institut für die Anfertigung der
Schnitte und Frau Ritter aus der Dermatologischen Klinik
für die photographische Entwicklung der Präparate.

Ich bedanke mich bei Herrn Privatdozenten Dr. B. Schell-
mann für die Überlassung des Themas und die wohlwollende
Unterstützung.

Lebenslauf

Name: Thomas Welscher

Geburtstag und -ort: 6. April 1954 in Erlangen

Eltern: Max und Wiltrud Welscher

Beruf des Vaters: Betriebsingenieur

Schulbildung: Volksschule in Erlangen von 1960 - 64
Ohmgynasium in Erlangen von 1964 - 73

Schulabschluß: Reifezeugnis am 8. Juni 1973

Erststudium: Lehramt für Realschulen (Biologie und Chemie) von WS 1973 bis SS 1977 an der Universität Erlangen-Nürnberg

Prüfung: 1. Staatsprüfung (beide Fächer) am 27. Mai 1977

Zweitstudium: Medizin ab SS 1977 an der Universität Erlangen-Nürnberg

Prüfungen: Ärztliche Vorprüfung am 20. März 1979 in Erlangen
Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung am 20. März 1980 in Erlangen
Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung am 19. März 1982 in Erlangen
Schriftlicher Teil des Dritten Abschnitts der Ärztlichen Prüfung am 7. April 1983
Mündlicher Teil des Dritten Abschnitts der Ärztlichen Prüfung am 26. April 1983

